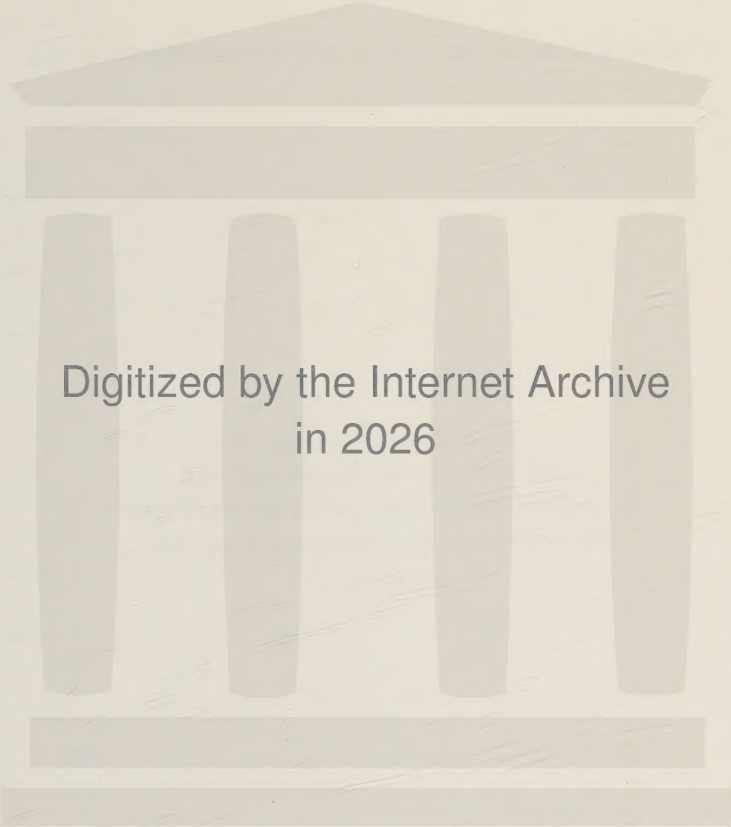


ZUR QUARTÄRSTRUKTUR VON MITOCHONDRIALEM CYTOCHROM B

Inauguraldissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Barbara Ziganke
aus Gorkij

München 1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553810_0058

ZUR QUARTÄRSTRUKTUR VON MITOCHONDRIALEM CYTOCHROM B

Inauguraldissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Barbara Ziganke
aus Gorkij

München 1976



Berichterstatter: Privatdozent Dr. Hanns Weiß

Professor Dr.Dr.h.c. Feodor Lynen

Tag der Einreichung der Arbeit: 29. April 1976

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Juli 1976

Diese Arbeit wurde im März 1973 am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München begonnen. Dem Direktor dieses Institutes, Herrn Professor Dr.Dr.h.c. Theodor Bücher, bin ich zu großem Dank verpflichtet.

Seit April 1975 wurde die Arbeit am Europäischen Laboratorium für Molekularbiologie in Heidelberg fortgeführt. Für die mir dort gewährte Gastfreundschaft bin ich sehr dankbar.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Hanns Weiß für die Überlassung dieses Themas und für die stete Hilfsbereitschaft.

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. ERGEBNISSE	3
2.1. Cytochrom b Präparation	3
2.1.1. Darstellung	3
2.1.2. Lichtabsorptionsspektren	7
2.1.3. Molekulargewicht	8
2.1.3.1. Molekulargewicht in Gegenwart von Desoxycholat	9
2.1.3.2. Molekulargewicht in Gegenwart von Dodecylsulfat	10
2.1.3.3. Molekulargewicht nach Quervernetzung	12
2.1.3.4. Minimales Molekulargewicht pro Mol Protohäm	14
2.2. Cytochrom b Untereinheiten	16
2.2.1. Auftrennung durch Chromatographie an Hydroxylapatit	16
2.2.2. Aminosäurezusammensetzung	18
2.2.2.1. Aminosäurezusammensetzung des Salzsäurehydrolysates	18
2.2.2.2. Bestimmung des Lysin zu Leucin Verhältnisses in den beiden Untereinheiten durch $in vivo$ Einbau von 3H -Lysin und ^{14}C -Leucin	19
2.2.2.3. Spektroskopischer Nachweis von Tyrosin und Tryptophan	21
2.2.2.4. Versuche zum Nachweis von N-terminalen Aminosäuren	21
2.2.3. Spaltprodukte	22
2.2.3.1. Proteolytische Spaltung	22
2.2.3.2. Bromcyan-Spaltung	22
3. MATERIAL UND METHODEN	26
3.1. Zucht von Neurospora crassa	26
3.2. Isolierung der Mitochondrien	26
3.3. Reindarstellung von Cytochrom b aus den Mitochondrienmembranen	27
3.3.1. Chromatographie an Oleyl-Polymethacrylsäure-Harz	27

3.3.2.	Chromatographie an DEAE-Cellulose	27
3.3.3.	Gelfiltration über Sephadex G-100	28
3.3.4.	Synthese von Oleyl-Polymethacrylsäure-Harz	28
3.4.	Vernetzungsreaktionen	30
3.5.	Auftrennung der Untereinheiten an Hydroxylapatit	30
3.6.	Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung	31
3.6.1.	Aminosäurezusammensetzung des Salzsäurehydrolysates	31
3.6.2.	Spektroskopische Bestimmung des Tyrosin- und Tryptophangehaltes	31
3.7.	Bromcyanspaltung und Auftrennung der Spaltprodukte	32
3.8.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
3.9.	Verschiedene analytische Methoden	34
4.	DISKUSSION	35
4.1.	Cytochrom b, ein dimeres Hämprotein	35
4.2.	Identität der Cytochrom b Untereinheiten	35
4.3.	Das dimere Cytochrom b, eine denaturierte Form des "b _T b _K -Paares"	36
4.4.	Vergleich der in der Literatur beschriebenen Cytochrom b Präparationen	37
4.5.	Cytochrom b, ein mitochondriales Translationsprodukt	40
5.	ZUSAMMENFASSUNG	42
6.	LITERATURVERZEICHNIS	44

LEBENS LAUF

1. EINLEITUNG

Durch kombinierte spektrophotometrische und potentiometrische Meßmethoden wurde in den letzten Jahren nachgewiesen, daß zwei funktionell verschiedene b-Cytochrome an der mitochondrialen Atmungskette beteiligt sind. Sie unterscheiden sich durch die Lage ihrer Lichtabsorptionsbanden, durch ihre Redoxpotentiale und durch ihre unterschiedliche Reduzierbarkeit in Gegenwart und in Abwesenheit des Atmungsgiftes Antimycin. Da beide b-Cytochrome bisher immer in äquimolarem Verhältnis gefunden wurden, lag die Vermutung nahe, daß diesem Cytochrompaar ein dimeres Hämprotein zugrunde liegt. (Eine Übersicht über diese funktionell unterscheidbaren b-Cytochrome wurde von Wikström (1) veröffentlicht.)

Aus der Mitochondrienmembran konnten durch Behandlung mit milden Detergenzien definierte elektronenübertragende Segmente dargestellt werden. Der kleinste Komplex, in dem die beiden Cytochrom b Arten noch in katalytisch aktiver Form vorliegen, besteht jedoch aus wenigstens sieben Proteinkomponenten (5). Alle Versuche, aus diesem sogenannten bc_1 -Komplex Cytochrom b weiter anzureichern, führten zu Präparationen, in denen die funktionellen Unterschiede der b-Cytochrome aufgehoben waren und in denen das Hämprotein in hochpolymerer Form vorlag (2,3,4,5). Diese Cytochrom b Präparationen erwiesen sich somit als ungeeignet für Untersuchungen der vermuteten Quartärstruktur.

Erst durch die Anwendung eines neuartigen Präparationsverfahrens, der chromatographischen Auftrennung von Desoxycholat-solubilisierten Mitochondrienmembranen an einem lipophilen Kationenaustauscher (6), war es möglich geworden, eine Cytochrom b Präparation zu isolieren, die in Gegenwart von Desoxycholat in niedermolekularer Form vorlag. Diese Präparation wurde für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente verwendet.

Das Ziel dieser Untersuchungen war die Aufklärung der Quartärstruktur von Cytochrom b. Damit sollte auf molekularer Ebene eine Erklärung für die in situ beobachtete funktionelle Dimerität von Cytochrom b gefunden werden.

Als Organismus für diese Untersuchungen wurde *Neurospora crassa* gewählt. Gegenüber Säugetierzellen zeigt dieser rasch wachsende Schimmelpilz den Vorteil, daß seine Proteine durch in vivo Einbau radioaktiver Aminosäuren markiert werden können (9). Damit wird ein rascher und sehr empfindlicher quantitativer Proteinnachweis auch in Gegenwart hoher Salz- und Detergenskonzentrationen möglich.

Ein Teil der erzielten Ergebnisse wurde an anderer Stelle bereits veröffentlicht (8,9,10,11).

2. ERGEBNISSE

2.1. Cytochrom b Präparation

2.1.1. Darstellung

Im folgenden ist die Reindarstellung von Cytochrom b aus radioaktiv markierten Mitochondrienmembranen des Schimmelpilzes *Neurospora crassa* beschrieben. Zur Markierung waren zu einer Pilzkultur in der exponentiellen Wachstumsphase gleichzeitig ^3H -Lysin (1,25 mCi/g Zellprotein) und ^{14}C -Leucin (0,06 mCi/g Zellprotein) dem Kulturmedium zugesetzt worden. Eine Generationszeit danach, als alle Radioaktivität in das Protein eingebaut war (9), wurden die Pilzhyphen geerntet und die Mitochondrien isoliert (12,13). Die Mitochondrienmembranen wurden mit Desoxycholat lysiert und anschließend wurde Cytochrom b durch die folgenden chromatographischen Schritte isoliert (6):

a. Chromatographie an Oleyl-Polymethacrylsäure-Harz: Das gesamte Membranlysat wurde zunächst an das amphipatische Harz gebunden, wobei die Carboxylat-Gruppen und die Oleylketten des Harzes die Detergensmoleküle verdrängten. Anschließend daran wurde mit einer Cholat- und Desoxycholat-haltigen Pufferlösung der Großteil der Proteine herausgewaschen und verworfen. Durch einen darauffolgenden Salzgradienten wurde Cytochrom b eluiert und in Fraktionen aufgesammelt. Abbildung 1 zeigt das auf diese Weise erhaltene Elutionsdiagramm: durch die Extinktion bei 417 nm ist Cytochrom b dargestellt, durch die ^3H -Radioaktivität das proteingebundene Lysin und durch die ^{14}C -Radioaktivität das proteingebundene Leucin.

b. Chromatographie an DEAE-Cellulose: Dieser Schritt diente der Konzentrierung der Cytochrom b Präparation. Die Fraktionen mit dem höchsten Cytochrom b Gehalt (siehe Abb. 1, horizontale eckige Klammer) wurden vereinigt und zur Ernied-

rigung der Salzkonzentration gegen Wasser dialysiert. Danach wurde das ganze Protein an DEAE-Cellulose gebunden und schließlich durch eine Cholat-, Desoxycholat- und KCl-haltige Lösung in konzentrierter Form wieder eluiert.

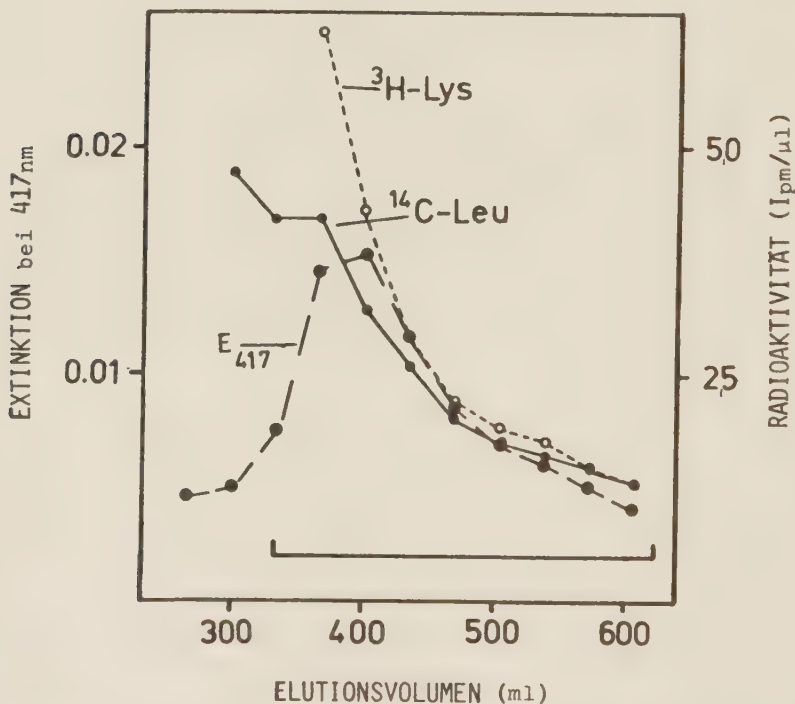


Abbildung 1: Elutionsprofil der Cytochrom b Präparation nach Chromatographie an Oleyl-Polymethacrylsäure-Harz. Das Protein war durch in vivo Einbau von ^3H -Lysin und ^{14}C -Leucin radioaktiv markiert worden (siehe Kap. 3.3.). Der mit der horizontalen eckigen Klammer gekennzeichnete Volumenbereich wurde weiterverwendet.

c. Gelfiltration über Sephadex: Die konzentrierte rohe Cytochrom b Präparation wurde durch Gelfiltration über eine 1,5 m lange Sephadex G-100 Säule in einer Cholat-, Desoxy-

cholat- und KCl-Lösung weiter gereinigt. Wie in Abbildung 2A zu sehen ist, wurde Cytochrom b dabei von dem größten Teil der Fremdproteine getrennt, wodurch der spezifische Cytochrom b Gehalt der Präparation nochmals um das 3-4-fache erhöht wurde. Die Proteinverunreinigungen betrugen nur noch 10-20%. Durch Wiederholung der Gelfiltration nach vorheriger Konzentrierung konnten sie auf etwa 5% verringert werden (Tab. 1).

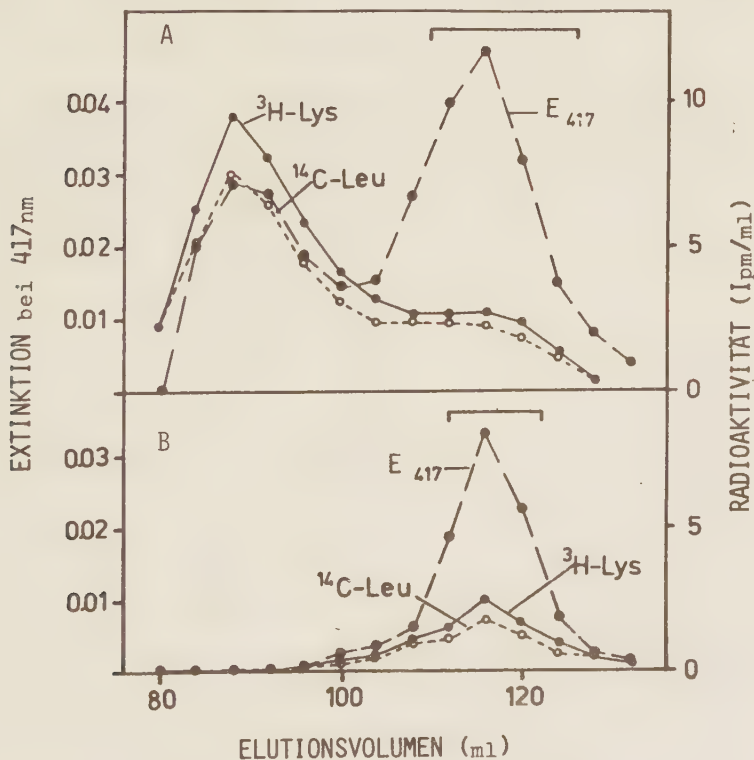


Abbildung 2: Elutionsprofil der Cytochrom b Präparation nach Gelfiltration über Sephadex G-100. (A) 1. Gelfiltration, (B) 2. Gelfiltration.

Das Protein war durch in vivo Einbau von ^3H -Lysin und ^{14}C -Leucin radioaktiv markiert worden (siehe Kap. 3.3.3.). Die Fraktionen unter der horizontalen eckigen Klammer wurden jeweils weiterverarbeitet.

Wie Abb. 2 B zeigt, fiel nach dieser zweiten Gelfiltration das Elutionsprofil der Extinktion bei 417 nm mit dem Elutionsprofil der ^3H - und ^{14}C -Radioaktivität zusammen.

Die Ergebnisse dieser Reinigungsschritte sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Der spezifische Cytochrom b Gehalt der Präparation war gegenüber dem spezifischen Cytochrom b Gehalt der Mitochondrienmembran ungefähr 30-fach angereichert. Die Ausbeute betrug allerdings nur etwa 1%.

Tabelle 1: Cytochrom b Präparation aus Mitochondrienmembranen von *Neurospora crassa*. Das Protein war durch in vivo Einbau von ^3H -Lysin und ^{14}C -Leucin radioaktiv markiert worden.

Präparation	Protein (mg)	Volumen (ml)	^{14}C ($10^{-3}\times\text{Ipm}$)	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	Cyt. b (nMol)
Mitochondrienmembranen	312,0*	14,5	24 454	1,86	312,0
Cytochrom b nach Chromatographie an Ole-yl-Polymethacrylsäure-Harz		300,0	744	1,31	28,0
Cytochrom b nach Chromatographie an DEAE-Cellulose		4,5	307	0,93	15,8
Cytochrom b nach 1. Gelfiltration über Sephadex		18,0	47	0,82	5,6
Cytochrom b nach Chromatographie an DEAE-Cellulose		1,6	43	0,80	5,1
Cytochrom b nach 2. Gelfiltration über Sephadex		13,0	25	0,75	3,1
Cytochrom b nach Chromatographie an DEAE-Cellulose	0,1*	0,3	24	0,75	3,0

* Bestimmt mit der Biuret- oder mit der Lowry-Methode.

Wie in der Tabelle 1 zusätzlich zu sehen ist, fällt das Verhältnis der ^3H -Radioaktivität zur ^{14}C -Radioaktivität mit zunehmender Reinheit von Cytochrom b stark ab. So betrug der $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ Quotient für die cytoplasmatischen Proteine 2,74, für die Proteine der Mitochondrien Matrix 2,85, für die Gesamtheit der Mitochondrien-Membranproteine 1,86 und für die Cytochrom b Präparation nur 0,75. Dies deutete auf ein ungewöhnlich niedriges Verhältnis von Lysin zu Leucin im Cytochrom b Protein hin (siehe Kap. 2.2.2.1).

2.1.2. Lichtabsorptionsspektren

Die Präparation zeigte sowohl in der oxidierten als auch in der reduzierten Form die für Cytochrom b charakteristischen Absorptionsbanden. In Abbildung 3 sind die Absolutspektren der Sauerstoff-oxydierten Form und der Dithionit-reduzierten Form wiedergegeben.

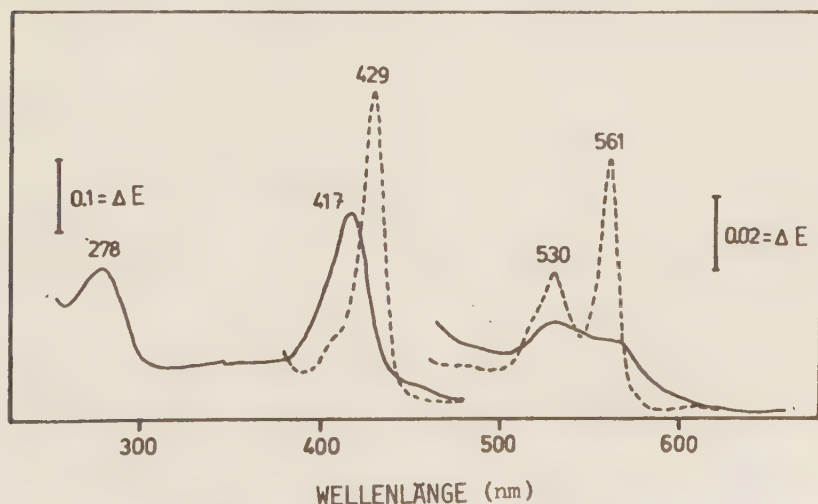


Abbildung 3: Lichtabsorptionsspektrum von Cytochrom b
(—) oxydierte Form, (----) reduzierte Form.

Als ein Reinheitskriterium der Präparation wurde das Verhältnis der Extinktion des Hämanteiles bei 417 nm zur Extinktion des Proteinanteiles bei 278 nm verwendet. Dieses Verhältnis betrug 1,7.

Die Hämgruppe konnte durch eine Aceton-Salzsäure-Lösung vom Protein extrahiert werden. Das Hämochromogen zeigte in Pyridin-Natronlauge das für Protohäm charakteristische Absorptionsspektrum (14) (Abb.4).

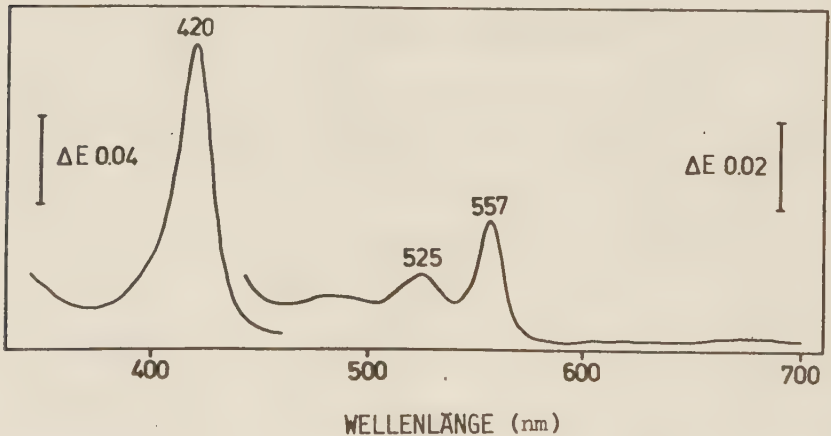


Abbildung 4: Pyridin-Hämochromogen-Spektrum der Hämkomponente der Cytochrom b Präparation.

2.1.3. Molekulargewicht

Molekulargewichtsbestimmungen des isolierten Cytochrom b bzw. des Cytochrom b Apoproteins wurden in Gegenwart von Desoxycholat bzw. Dodecylsulfat durchgeführt. Nur mit Hilfe dieser Detergenzien konnte die Präparation in Lösung gehalten werden. Während jedoch in Desoxycholat die Hämgruppe am Protein gebunden blieb und das charakteristische Absorptionsspektrum zeigte, wurde sie in Dodecylsulfat vom Proteinanteil abgespalten.

2.1.3.1. Molekulargewicht in Gegenwart von Desoxycholat

Abbildung 5 zeigt das Ergebnis einer Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration über Sephadex G-100 in einer Desoxycholat- und KCl-Lösung. Cytochrom b erschien als symmetrischer "Peak". Der Verlauf der Extinktion des Hämanteiles bei 417 nm, des Proteinanteiles bei 278 nm und des mit der Lowry-Methode bestimmten Proteingehaltes (15) im Eluat fallen weitgehend zusammen.

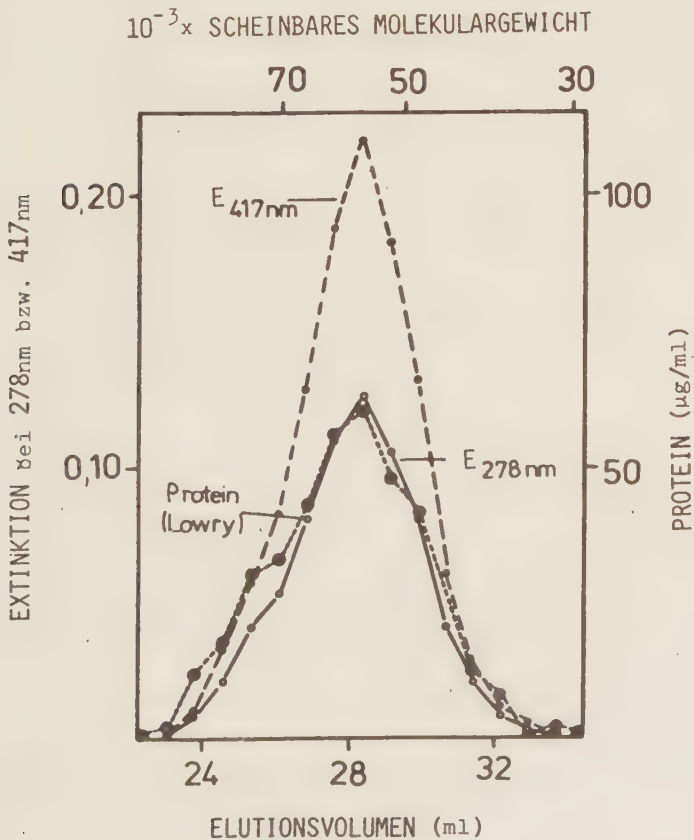


Abbildung 5: Molekulargewichtsbestimmung der Cytochrom b Präparation durch Gelfiltration in Gegenwart von Desoxycholat.

Die Eichung des Elutionsvolumens mit Hilfe von Proteinen bekannten Molekulargewichtes (Rinderserumalbumin, Albumin aus Hühnerei, Chymotrypsinogen, Myoglobin, Cytochrom c) ergab für die Cytochrom b Präparation ein scheinbares Molekulargewicht von 58 000. Bei dieser Methode wurde jedoch vorausgesetzt, daß Cytochrom b die gleiche Menge Desoxychololat spezifisch bindet wie die verwendeten Eichproteine. Bindungsversuche mit radioaktiv markiertem Desoxychololat ergaben aber, daß Cytochrom b ungefähr 30% seines Eigengewichtes an Desoxychololat bindet (11), Albumin dagegen nur etwa 7% und die anderen Proteine weniger als 2% (16, 17). Deshalb stellte diese Methode zur Molekulargewichtsbestimmung nur ein Näherungsverfahren dar.

Eine genauere Bestimmung des Molekulargewichtes von Cytochrom b in Gegenwart von Desoxychololat wurde von Weiß und Kolb (11) durchgeführt. Sie bestimmten das Sedimentations-Gleichgewicht in einer Desoxychololat-Lösung und berücksichtigten bei der Berechnung des Molekulargewichtes die gebundene Menge des Detergens wie von Tanford et al. beschrieben wurde (18). Dabei ergab sich ein etwas niedrigeres Molekulargewicht von 51 000.

2.1.3.2. Molekulargewicht in Gegenwart von Dodecylsulfat

Eine allgemein angewandte Methode zur Molekulargewichtsbestimmung von Protein-Untereinheiten ist die Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von Dodecylsulfat (19). Wie Abbildung 6 zeigt, wanderte der Proteinanteil der Cytochrom b Präparation im allgemeinen als eine Bande. Gelegentlich, besonders nach langer Wanderungsstrecke, wurde eine leichte Aufspaltung in zwei Banden gleicher Intensität beobachtet. Der Vergleich der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit des Cytochrom Proteins mit der Wanderungsgeschwindigkeit von Eichproteinen ergab ein Molekulargewicht von 30 000, wenn 12,5% Polyacrylamid-Gele verwendet wurden, bzw. von 27 000 bei der Verwendung von 7,5% Polyacrylamid-Gelen.

- 11 -
 $10^{-3} \times$ SCHEINBARES MOLEKULARGEWICHT

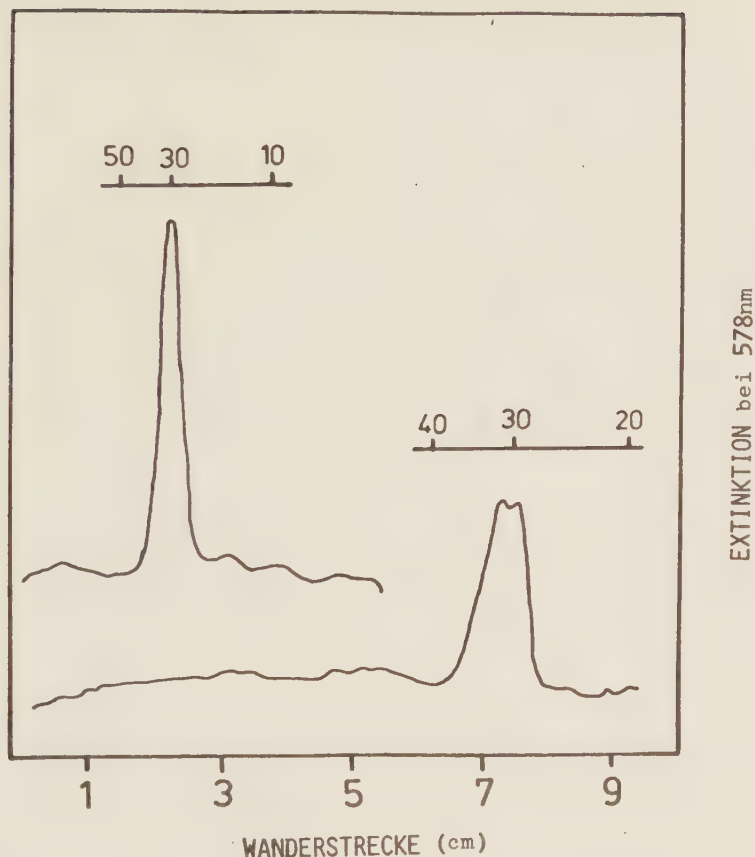


Abbildung 6: Densitogramm einer Dodecylsulfat-Gelelektrophorese von Cytochrom b nach Anfärbung mit Coomassie-Brillant-Blau. Es wurde ein 12,5% Polyacrylamid-Gel verwendet.

Auch bei dieser Methode wird davon ausgegangen, daß alle Polypeptide etwa die gleiche Menge Detergens (ungefähr 1,4 g/g) spezifisch binden (20). Wie erste Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigten (16), binden jedoch die meisten Membran-

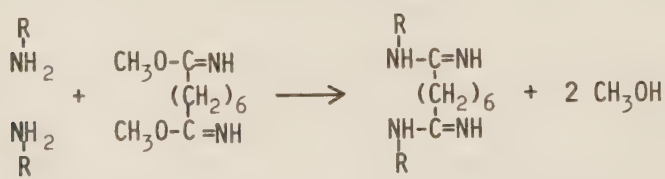
proteine mehr Dodecylsulfat, als die zur Eichung verwendeten wasserlöslichen Proteine. Damit ist auch das durch Dodecylsulfat-Gelelektrophorese erhaltene Molekulargewicht des Cytochrom b etwas zu hoch.

2.1.3.3. Molekulargewicht nach Quervernetzung

Auffallend war, daß das Molekulargewicht der Cytochrom b Präparation in Gegenwart von Dodecylsulfat nur ungefähr halb so groß war wie das Molekulargewicht in Gegenwart von Desoxycholat. Es lag deshalb nahe, daß die Cytochrom b Präparation ein dimeres Protein mit zwei etwa gleichgroßen Untereinheiten darstellt. Die gelegentlich beobachtete Aufspaltung des Cytochrom b Apoproteins bei der Gelelektrophorese war ein erster Hinweis, daß ein Unterschied zwischen den Untereinheiten vorliegen muß.

Um diese vermutete Quartärstruktur weiter zu untermauern, wurde die Cytochrom b Präparation mit den bifunktionellen Reagenzien Dimethylsuberimidat (21) und Glutardialdehyd (22) behandelt und anschließend das Molekulargewicht der Reaktionsprodukte durch Dodecylsulfat-Gelelektrophorese bestimmt (Abb.7).

Bei niedriger Proteinkonzentration führen diese Reagenzien hauptsächlich zu intramolekularer Vernetzung oligomerer Proteine. Dimethylsuberimidat reagiert dabei mit den freien Aminogruppen der Lysinreste nach folgendem Schema:



Glutardialdehyd hat eine geringere Spezifität für einen bestimmten Typ funktioneller Gruppen. Vermutlich reagieren im wesentlichen Thiol- und Aminogruppen.

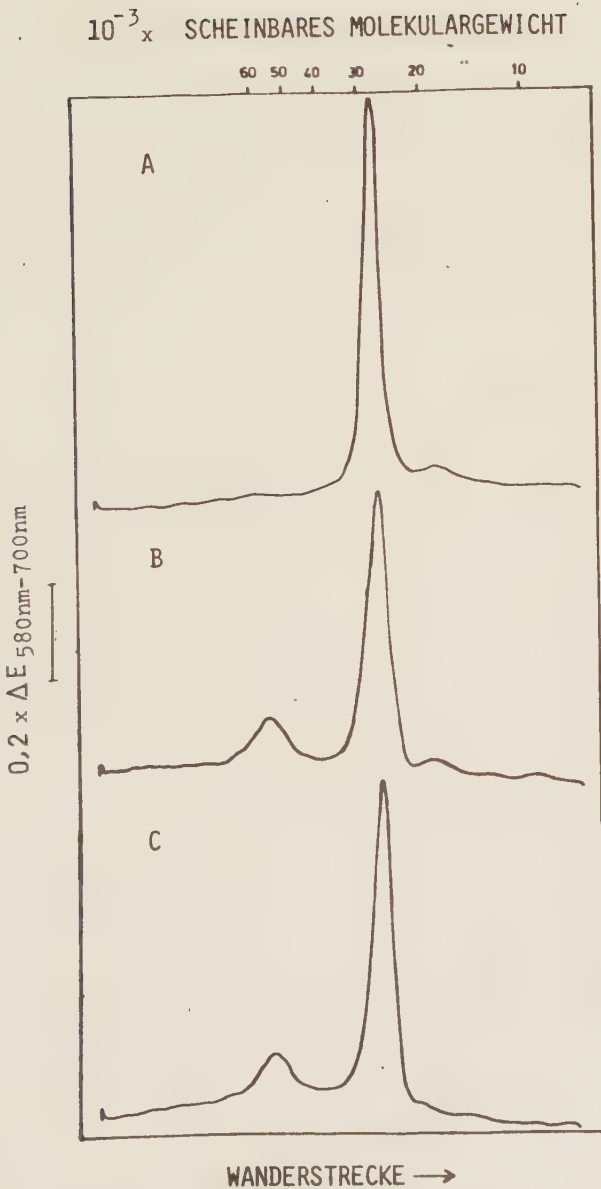


Abbildung 7: Dodecylsulfat-Gelelektrophorese der Cytochrom b Präparation nach Reaktion der Untereinheiten mit Dimethylsüberimidat in Gegenwart von Dodecylsulfat (A) und nach Reaktion mit Dimethylsüberimidat bzw. Glutardialdehyd in Gegenwart von Desoxycholat (B bzw. C). Densitogramm nach Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau.

In Gegenwart von Desoxycholat trat nach der Vernetzung mit Dimethylsuberimidat bzw. Glutardialdehyd eine zusätzliche Bande mit dem Molekulargewicht von 55 000 auf (B,C). Hingegen entstand kein Vernetzungsprodukt, wenn das Cytochrom b vor der Zugabe der Reagenzien mit Dodecylsulfat dissoziiert wurde (A).

Dieses Ergebnis bestätigte die Vermutung, daß Cytochrom b in Desoxycholat als dimeres Protein vorliegt, das durch Dodecylsulfat in zwei etwa gleichgroße Untereinheiten dissoziiert wird.

Im Vergleich zu dem oligomeren Protein Glutamat-Dehydrogenase (21) war die Reaktionsfähigkeit der Cytochrom b Präparation mit den bifunktionellen Reagenzien auffallend gering. Die Ursache dafür könnte sein, daß Cytochrom b sehr wenige Lysinreste enthält (siehe Tab.3) und daß diese zusätzlich noch modifiziert oder sterisch gehindert sind.

2.1.3.4. Minimales Molekulargewicht pro Mol Protohäm

Der Hämgehalt der Cytochrom b Präparation wurde aus dem Absorptionsspektrum mit Hilfe der molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{417\text{ox}} = 102 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und Tab.5) (8) ermittelt.

Der Proteingehalt wurde sowohl mit der Lowry-Methode (15) als auch durch quantitative Aminosäureanalyse bestimmt. Bei der Methode nach Lowry wurde Rinderserumalbumin als Standard verwendet. Es ergab sich ein spezifischer Hämgehalt von $34 \mu\text{Mol/g}$ Protein.

Bei der quantitativen Aminosäureanalyse wurde eine Cytochrom b Probe nach Zusatz von Norleucin als innerem Standard hydrolysiert. Von diesem Hydrolysat wurde die Aminosäurezusammensetzung bestimmt, und daraus wurde unter Berücksichtigung der Hydrolyseverluste mit Hilfe der Molekulargewichte der Aminosäuren der Gesamtproteingehalt ermittelt. Mit diesem Wert errechnete sich der spezifische Hämgehalt zu $37 \mu\text{Mol/g}$ Protein. Die beiden für den spezifischen Häm-Gehalt erhaltenen Werte ergaben ein minimales Molekulargewicht von 27 000 - 29 000 pro Mol Protohäm. In diesem Bereich lag auch in etwa das in Gegenwart

von Dodecylsulfat ermittelte Molekulargewicht für Cytochrom b. Damit war gezeigt, daß das dimere Cytochrom b zwei Hämgruppen trägt.

Eine Übersicht über die Ergebnisse der verschiedenen Molekulargewichtsbestimmungen gibt Tabelle 2. In diese Tabelle sind auch die Ergebnisse der von Weiß und Kolb (11) durchgeführten analytischen Ultrazentrifugation von Cytochrom b in einer Desoxycholat-Lösung aufgenommen.

Tabelle 2: Molekulargewicht der Cytochrom b Präparation

Bestimmungsmethode	Molekulargewicht
Cytochrom b-Desoxycholat-Komplex	
Sedimentations- und Diffusions-Koeffizient nach Svedberg (11,23)	63 000
Sedimentations-Gleichgewicht nach Yphantis (11,24)	62 000
Gelfiltration über Sephadex	58 000
Sedimentationsgleichgewicht und Berücksichtigung des Proteingebundenen Desoxycholat nach Tanford et al. (11,18)	51 000
Cytochrom b-Dodecylsulfat-Komplex	
Elektrophorese in 7,5% Polyacrylamid-Gelen	27 000
in 12,5% Polyacrylamid-Gelen	30 000
Gelfiltration über Sephadex G-100	30 000
Dodecylsulfat-Komplex nach Quervernetzung	
Elektrophorese in 7,5% Polyacrylamid-Gelen	55 000
Minimales Molekulargewicht aus spezifischem Hämgehalt	
Proteinbestimmung nach Lowry (15)	29 000
quantitative Aminosäure-Analyse	27 000

2.2. Cytochrom b Untereinheiten

2.2.1. Auftrennung durch Chromatographie an Hydroxylapatit

Die Ergebnisse des vorhergehenden Abschnittes hatten gezeigt, daß die Cytochrom b Präparation ein dimeres Hämprotein darstellt, das aus zwei etwa gleichgroßen Untereinheiten aufgebaut ist. Die Trennung der beiden Polypeptidketten gelang in Gegenwart von Dodecylsulfat durch Chromatographie an Hydroxylapatit (25).

Bei einer niedrigen Phosphatkonzentration wurde das Cytochrom b Apoprotein an Hydroxylapatit gebunden und anschließend mit einem linearen Phosphatgradienten in zwei sich etwas überlappenden Fraktionen ungefähr gleicher Proteinmenge eluiert (Abb.8A, Fraktion I bei 0,38 M Phosphat, Fraktion II bei 0,45 M Phosphat).

Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit dieser Trennmethode wurde Fraktion I einer ^{14}C -Leucin markierten Cytochrom b Präparation mit Fraktion II einer ^3H -Leucin markierten Cytochrom b Präparation vereinigt und erneut chromatographiert. Beide Fraktionen wurden wieder bei derselben Phosphatkonzentration eluiert wie beim ersten Mal.

Die Fraktionen zeigten bei Gelfiltration bzw. bei Gelelektrophorese in Dodecylsulfat ein Molekulargewicht von etwa 30 000. Damit war nahegelegt, daß diese Fraktionen die beiden Untereinheiten des Cytochrom b darstellen.

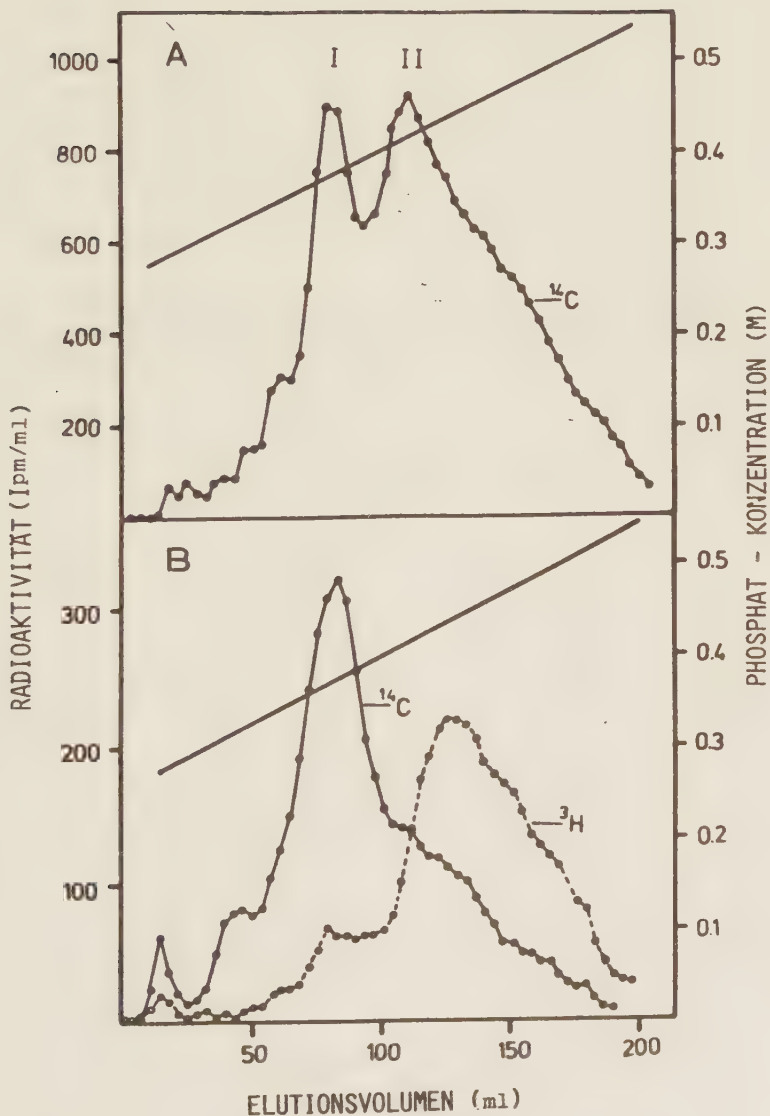


Abbildung 8: Hydroxylapatit-Chromatographie von Cytochrom b in Dodecylsulfat (A) ^{14}C -Leucin markiertes Cytochrom b, (B) Fraktion I von ^{14}C -Leucin markiertem Cytochrom b vereinigt mit Fraktion II von ^3H -Leucin markiertem Cytochrom b.

2.2.2. Aminosäurezusammensetzung

2.2.2.1. Aminosäurezusammensetzung des Salzsäure-Hydrolysates

Die Aminosäurezusammensetzung beider Untereinheiten wurde nach 24-, 50- bzw. 120-stündiger Hydrolyse mit Salzsäure bestimmt (26). Tabelle 3 zeigt die Mittelwerte von 3-5 Einzelbestimmungen zweier unabhängiger Präparationen.

Tabelle 3: Aminosäurezusammensetzung von Cytochrom b und den Cytochrom b Untereinheiten. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte aus 3-5 Einzelbestimmungen von zwei unabhängigen Präparationen

Amino- säure	Untereinheit I		Untereinheit II		Cytochrom b	
	(Mol %)					
Asp	8.64	8.31	8.90	8.15	8.61	8.57
Thr	4.82	4.95	4.83	5.04	4.75	4.85
Ser	7.89	8.54	7.92	8.95	8.68	8.42
Glu	7.21	7.58	5.93	5.71	6.28	6.19
Pro	5.01	4.98	5.09	5.03	5.06	5.00
Gly	7.25	7.37	7.42	7.89	7.49	7.58
Ala	7.80	7.61	7.71	7.51	7.82	7.64
Cys*	1.24	1.23	0.66	0.65	0.89	0.90
Val	6.95	6.65	6.97	6.83	6.86	6.91
Met*	2.10	2.22	2.75	2.69	2.39	2.43
Ile	8.86	8.52	8.74	8.34	8.73	8.80
Leu	11.96	11.70	13.29	13.11	12.53	12.74
Tyr	4.21	4.01	4.18	4.22	4.24	4.10
Phe	5.66	5.70	6.71	6.76	6.42	6.50
Lys	3.66	3.75	2.74	2.82	3.06	3.03
His	2.53	2.56	2.52	2.58	2.50	2.58
Arg	4.21	4.31	3.64	3.72	3.70	3.77
Summe	100.00	99.99	100.00	100.00	100.01	100.01
Polari- tät (27)	38.96	40.00	36.48	36.97	37.58	37.41
Mittel- wert	39.48		36.73		37.50	

* Bestimmung nach Perameisensäureoxydation

Beide Untereinheiten sind in ihrer Aminosäurezusammensetzung sehr ähnlich. Ein Unterschied wurde hauptsächlich im Lysin- und im Cysteingehalt gefunden. 3,70 Mol% Lysin und 1,24 Mol% Cystein in Untereinheit I bedeuten unter der Annahme eines Molekulargewichtes von 28 000 einen Gehalt von sieben Lysin- und von zwei Cysteinresten. 2,78 Mol% Lysin und 0,66 Mol% Cystein in Untereinheit II entsprechen damit fünf Lysinresten und einem Cysteinrest.

Der Gehalt an Aminosäuren mit polaren Seitenketten, besonders den basischen, ist auffallend niedrig. So enthält Cytochrom b nur 2-3 Mol% Lysin und 2-3 Mol% Histidin, dagegen aber 13-14 Mol% Leucin und 8-9 Mol% Isoleucin.

Nach einem Vorschlag von Capaldi und Vanderkooi (27) wurde ein Polaritätsindex für Proteine als Summe der Molenbrüche der polaren Aminosäuren Asp, Thr, Ser, Glu, Lys, His und Arg definiert. Für Cytochrom b und für die Cytochrom b Untereinheiten beträgt dieser Wert etwa 38%.

2.2.2.2. Bestimmung des Lysin zu Leucin Verhältnisses in den beiden Untereinheiten durch in vivo Einbau von ^3H -Lysin und ^{14}C -Leucin

Zur Bestätigung des unterschiedlichen Lysin-Gehaltes beider Untereinheiten wurde Cytochrom b aus Zellen isoliert, deren Protein durch in vivo Einbau von ^3H -Lysin und ^{14}C -Leucin radioaktiv markiert worden war. (Diese Präparation ist in Kap. 2.2.1. ausführlich beschrieben). Die Untereinheiten wurden durch Chromatographie an Hydroxylapatit aufgetrennt und auf eingebaute ^3H - und ^{14}C -Radioaktivität untersucht.

Das Ergebnis ist in Abbildung 9 gezeigt. Für die Quotienten ^3H -Lysin zu ^{14}C -Leucin der beiden Untereinheiten ergab sich ein Verhältnis von 1,41 zu 1.

Dieser Wert stimmt mit dem durch die Aminosäureanalyse er-

haltenen Verhältnis der Lysin zu Leucin-Quotienten überein.
(siehe Tab. 4)

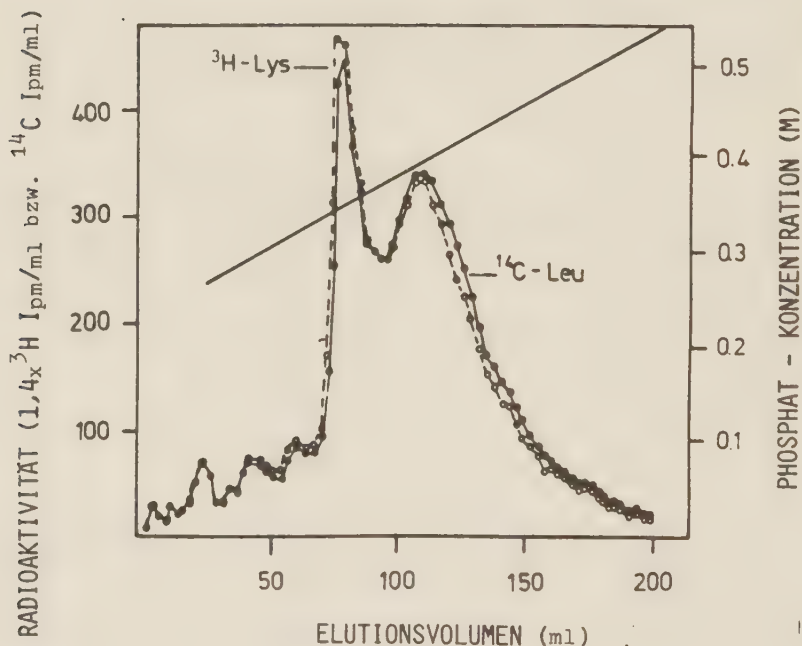


Tabelle 4: Verhältnis von Lysin zu Leucin in Cytochrom b und den Untereinheiten

Präparation	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	Verhältnis Lysin/Leucin
Cytochrom b	0,75*	0,24
Untereinheit I	0,83**	0,31
Untereinheit II	0,59	0,22
I/II	1,41	1,41

* vergl. Tab. 1, Kap. 2.1.1.

** errechnet aus den Fraktionen mit dem höchsten Reinheitsgrad (Untereinheit I 75-80 ml, Untereinheit II 125-150 ml)

2.2.2.3. Spektroskopischer Nachweis von Tyrosin und Tryptophan

Der Tryptophan-Gehalt der Cytochrom b Präparation wurde mit Hilfe der von Bencze und Schmid beschriebenen spektroskopischen Methode bestimmt (28). Dazu wurden 5 nMol Cytochrom b in Gegenwart von Desoxycholat in 1N Natronlauge gelöst und das Absorptionsspektrum des Proteinanteiles im UV-Bereich gemessen. Aus der Extinktion von Tyrosin bei 293nm und von Tryptophan bei 278nm ergab sich ein molares Verhältnis dieser beiden Aminosäuren von 1,42 und eine Gesamtmenge von 10,88µg (siehe Tab. 4, Kap. 3.6.2.). Bei einem Molekulargewicht von 28 000 für Cytochrom b ergibt sich daraus ein Tryptophangehalt von 5 nMol und ein Tyrosingehalt von 7 nMol. Der letzte Wert entspricht dem aus der Aminosäureanalyse erhaltenen Wert von 4,1 Mol%. Damit beträgt der relative Anteil an Tryptophan 2,85 Mol%.

2.2.2.4. Versuche zum Nachweis von N-terminalen Aminosäuren

Zum Nachweis einer N-terminalen Aminosäure wurde die Dansylchloridmethode (29) angewendet. Das nicht fluoreszierende Reagenz reagiert mit den freien Aminogruppen von Peptiden und Proteinen unter der Bildung eines grünlich-gelb fluoreszierenden Sulfonamids. Nach der Hydrolyse des Peptides bzw. Proteins werden die Aminosäuren durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die Amino-endständige Aminosäure wird durch die Fluorescens identifiziert.

Mit dieser Methode konnte jedoch weder beim Cytochrom b noch bei den Untereinheiten eine N-terminale Aminosäure nachgewiesen werden. Da diese Aminosäure beim Cytochrom b modifiziert sein könnte, wurde die Probe zur Hydrolyse einer Formamidbindung vor der Reaktion mit Dansylchlorid zwei Stunden in einer Lösung von Salzsäure in Methanol incubiert (30). Auch danach wurde keine N-terminale Aminosäure gefunden.

2.2.3. Spaltprodukte

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Cytochrom b Untereinheiten spezifisch gespalten und die dabei entstandenen Bruchstücke verglichen.

2.2.3.1. Proteolytische Spaltung

Bei der Spaltung mit Trypsin entstanden selbst nach Zugabe großer Enzymmengen (30% w/w) zu einer Cytochrom b Lösung in Dodecylsulfat oder in Desoxycholat nur wenige Bruchstücke in variabler Menge. Vorhergehende Entfernung der Detergenzien durch Ionenaustauschchromatographie führte zur vollständigen Resistenz gegen dieses Enzym.

2.2.3.2. Bromcyan-Spaltung

Bromcyan spaltet spezifisch die Peptidbindungen, an denen die Carboxylgruppe eines Methioninrestes beteiligt ist (31). Damit waren pro Untereinheit des Cytochrom b nach vollständiger Spaltung maximal 6 Bruchstücke mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 4 500 - 5 000 zu erwarten.

Diese Fragmente konnten nur in drei von mehreren versuchten Lösungsmitteln gelöst werden. In Phenol-Ameisensäure-Wasser (1:2:2, w:v:v), in Dodecylsulfat-Harnstoff und in 85% Ameisensäure.

Bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Phenol-Ameisensäure-Wasser bzw. in Dodecylsulfat-Harnstoff wurden etwa 80% des Proteins als Peptidbanden im Molekulargewichtsbereich von 8 000 - 1 500 gefunden. Die Reproduzierbarkeit der Auflösung war jedoch nicht befriedigend. Ein Ergebnis einer Auftrennung in Dodecylsulfat-Harnstoff ist in Abb. 10 gezeigt.

Eine gut reproduzierbare Auftrennung der Spaltprodukte wurde durch die Gelfiltration über Bio-Gel P-30 in 85% Ameisensäure erzielt (Abb. 11A). 85% des eingesetzten Proteins wurden

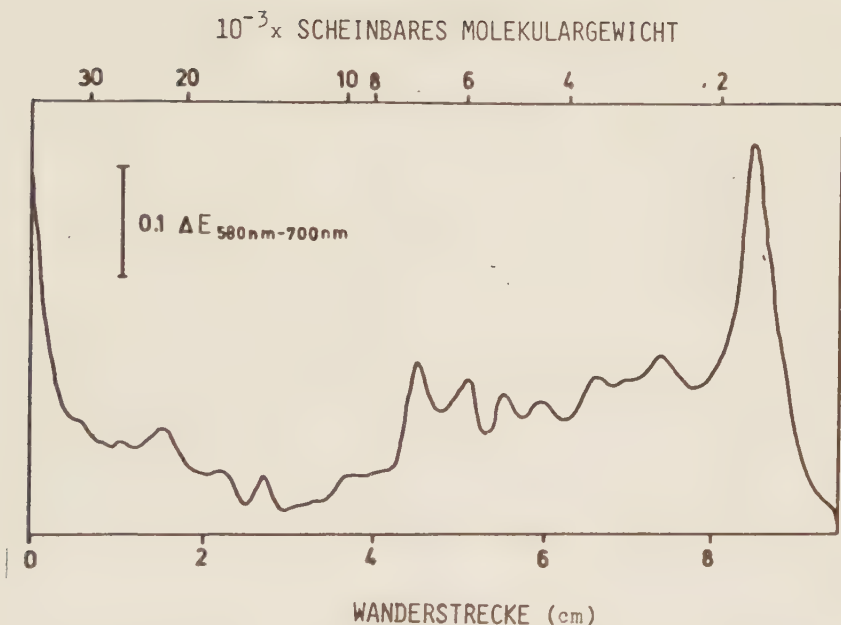


Abbildung 10: Dodecylsulfat-Harnstoff-Gelelektrophorese der Peptide von Cytochrom b nach der Bromcyanspaltung. Die Banden wurden mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt und densitometriert.

Die Molekulargewichtsskala wurde durch die Wanderungsgeschwindigkeit von Cytochrom c, Insulin-A-Kette und Bacitracin geeicht.

im Molekulargewichtsbereich von 9 000 - 1 000 wiedergefunden.

Der relative Anteil der Bruchstücke mit den Molekulargewichten 9 000 und 8 000 variierte bei den einzelnen Spaltungen. Wahrscheinlich waren diese Peptide Produkte einer unvollständigen Spaltung. Der Hauptanteil der Peptide zeigte ein Molekulargewicht von 6 500 - 4 500. Form und Höhe des Elutionsprofils in diesem Bereich sprachen für das Vorliegen von mindestens drei sich überlappenden Bruchstücken. Weitere Bruchstücke wurden mit Molekulargewichten von 4 000, 3 000, 2 500 und 1 800 gefunden.

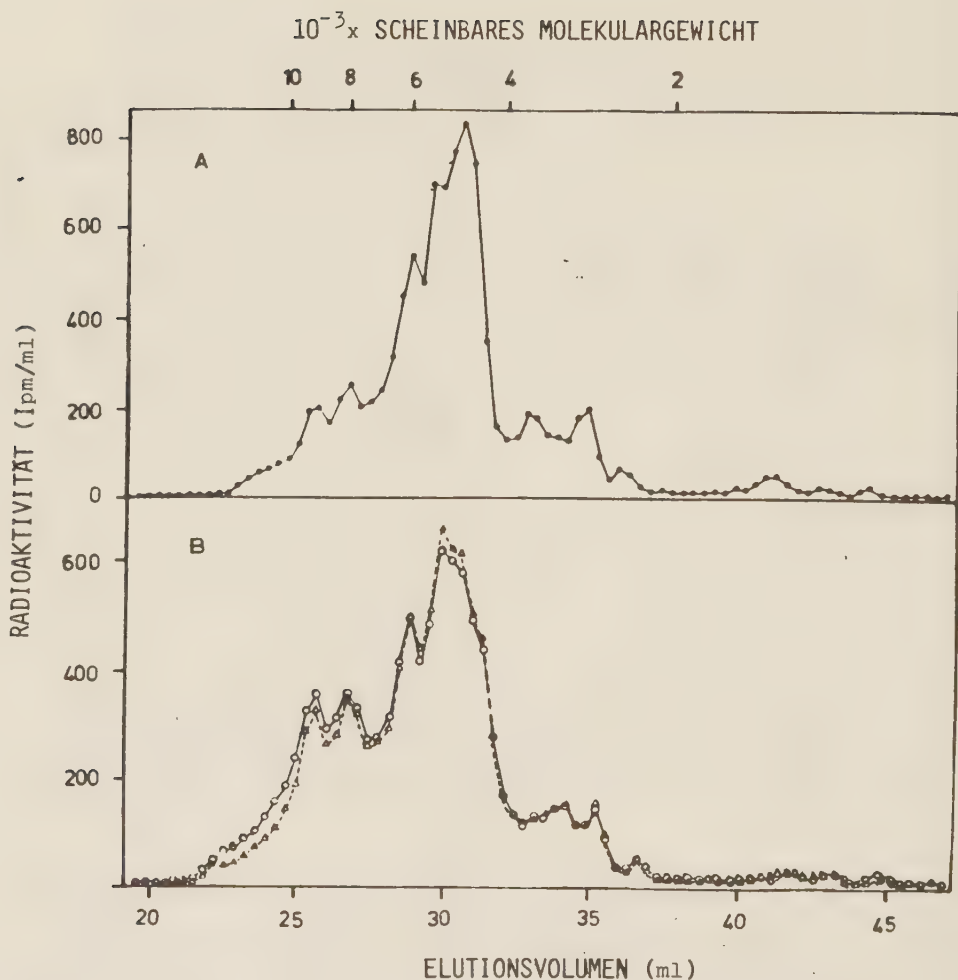


Abbildung 11: Trennung der Peptide von Cytochrom b nach Bromcyanspaltung durch Gelfiltration in 85% Ameisensäure. (A) Peptide von ^3H -Leucin markiertem Cytochrom b. (B) Peptide der Untereinheit I von ^3H -Leucin markiertem Cytochrom b (o—o—o) und der Untereinheit II von ^{14}C -Leucin markiertem Cytochrom b (Δ---Δ).

Zum Vergleich der Bruchstücke der beiden Cytochrom b Untereinheiten wurde die Untereinheit I von ^3H -markiertem Cytochrom b mit der Untereinheit II von ^{14}C -markiertem Cytochrom b vereinigt, mit Bromcyan gespalten und die Bruchstücke durch Gelfiltration in Ameisensäure aufgetrennt. Das Elutionsprofil der ^3H - und ^{14}C -Radioaktivität ist in Abbildung 11B dargestellt.

Wie zu sehen ist, fällt der Verlauf der ^3H -Radioaktivität mit dem Verlauf der ^{14}C -Radioaktivität sehr genau zusammen. Aus beiden Untereinheiten waren demnach Bruchstücke jeweils gleichen Molekulargewichtes in gleichem relativen Anteil entstanden. Dies bedeutet, daß die Methioninreste in beiden Ketten in gleicher Position liegen. Damit ist sehr wahrscheinlich, daß die **beiden** Untereinheiten über weite Bereiche die gleiche Primärstruktur besitzen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Zucht von Neurospora crassa

Neurospora crassa (Wildtyp 74A) wurde in Vogel's Minimalmedium (32) mit 2% Saccharose bei 25°C gezüchtet. 8-l-Zuchtkolben wurden mit 2×10^6 Konidien/ml inoculiert und unter ständiger Luftzufuhr belassen. Nach 18 Stunden (noch während der exponentiellen Wachstumsphase) wurden die Hyphen abfiltriert, mit Wasser gewaschen und bei -70°C aufbewahrt. Alle weiteren Präparationsschritte wurden bei 0-4°C durchgeführt (Vergleiche Tab.1).

3.2. Isolierung der Mitochondrien

Die Hyphen wurden im zehnfachen Volumen 0,25 M Saccharose, 10 mM Tris-Acetat pH 7,2 mit Hilfe eines Braun Haushalt-Mixgerätes homogenisiert. Die entstandene Zellsuspension wurde in einer Korundscheibenmühle (13) aufgeschlossen und die Mitochondrien daraus durch fraktionierte Zentrifugation (IEC, B-20-Zentrifuge) isoliert: Zur Entfernung der groben Zellbestandteile zunächst 5 min bei 1 500 g, der Überstand zur Sedimentation der Mitochondrien anschließend 20 min bei 20 000g. Um den Hauptanteil der Mitochondrienmatrix zu entfernen, wurde die Mitochondrienpräparation in 0,3 M KCl, 0,02 M Tris-Acetat pH 8 aufgenommen, 3 x 15 sec beschallt (Sonifier B 12, Branson Sonic Power Company) und 5 min bei 1 500 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand 1 h bei 40 000 g zentrifugiert. Die auf diese Weise sedimentierten Mitochondrienmembranen wurden in 0,3 M KCl, 0,02 M Tris-Acetat pH 8 in einer Konzentration von ungefähr 40 µg/ml aufgenommen und bei -70°C aufbewahrt.

3.3. Reindarstellung von Cytochrom b aus den Mitochondrienmembranen

3.3.1. Chromatographie an Oleyl-Polymethacrylsäure-Harz

20 g Oleyl-Polymethacrylsäure-Harz (33) (Synthese siehe Kap. 3.3.4.) wurden in etwa 100 ml 0,5 M Tris-Acetat pH 5,8 mit einem Sorvall-Omnimixer aufgeschlämmt und anschließend durch Wasserstrahlvakuum sorgfältig entgast. Danach wurde die Suspension in eine Säule (2,5 x 5,2 cm) gefüllt und mit Hilfe einer Peristaltic-Pumpe (Ismatec, Zürich) mit 0,5 M Tris-Acetat pH 5,8 äquilibriert. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 100 ml/h.

Zu der Mitochondriensuspension (ungefähr 7,5 ml mit 40 mg Protein/ml) wurden 3 ml 10% K-Desoxycholat Lösung dazugegeben, um eine Endkonzentration von 1 mg K-Desoxycholat/ mg Protein zu erreichen. Die Suspension wurde 10 min bei 30 000 g zentrifugiert und der bernsteinfarbene Überstand anschließend mit den oberen 2/3 der Säulenfüllung verrührt. Nachdem die Säule mit 0,5 M Tris-Acetat pH 8 (ca. 300 ml) äquilibriert worden war, wurde zuerst der größte Teil der Mitochondrienmembranproteine mit 0,5 M Tris-Acetat pH 8, 0,5 % K-Desoxycholat, 0,75% K-Cholat (600 ml) herausgewaschen und danach das Cytochrom b mit einem linearen Salzgradienten (400 ml), eluiert, der von 0,5 M Tris-Acetat pH 8, 0,75% K-Cholat, 0,5% K-Desoxycholat auf 0,5 M Tris-Acetat pH 8, 0,75 % K-Desoxycholat, 0,5% K-Cholat plus 1,5 M KCl anstieg. Es wurden Fraktionen zu 10 ml aufgefangen und spektroskopisch auf ihren Cytochrom b Gehalt untersucht.

3.3.2. Chromatographie an DEAE-Cellulose

Die Cytochrom b enthaltenden Fraktionen (siehe Kap.2.1.1., Abb.1, Volumenbereich 330-630 ml) wurden vereinigt und zur Erniedrigung der KCl-Konzentration 3-4 Stunden gegen Eiswasser dialysiert. Danach wurde die Lösung rasch über eine DEAE-

Cellulose SS-Säule (Serva, Heidelberg) (1,2 x 2 cm) gepumpt (300 ml/h), die zuvor mit 0,05 M Tris-Acetat pH 8, 0,5 % K-Cholat, 0,5% K-Desoxycholat äquilibriert worden war. Dabei wurde alles Cytochrom b an die Cellulose gebunden, wodurch sich die Cellulose rötlich anfärbte. Anschließend wurde Cytochrom b mit 1,5 M KCl, 0,05 M Tris-Acetat pH 8, 0,5% K-Cholat, 0,5% K-Desoxycholat als konzentrierte Lösung eluiert.

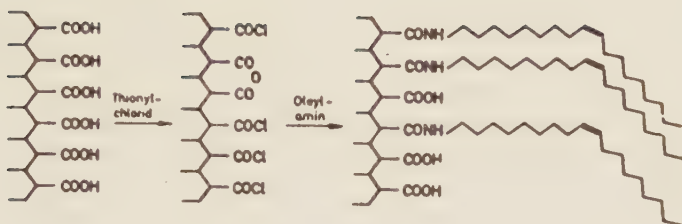
3.3.3. Gelfiltration über Sephadex G-100

Die rohe Cytochrom b Präparation wurde auf eine Sephadex G-100 Säule (Pharmacia, Uppsala) (1,5 x 150 cm) aufgetragen, die mit 0,2 M KCl, 0,05 M Tris-Acetat pH 8, 0,25% K-Cholat, 0,25% K-Desoxycholat äquilibriert war. Bei einem hydrostatischen Druck von 80 cm betrug die Durchflußgeschwindigkeit 5 ml/h. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 2 ml aufgesammelt und spektroskopisch auf den Gehalt an Cytochrom b untersucht. Nach diesem Schritt enthielt die Präparation meistens noch 20-30% Proteinverunreinigungen.

Zur weiteren Reinigung wurden die Cytochrom b enthaltenden Fraktionen (Kap. 2.1.1., Abb. 2, Volumenbereich 110-128ml) vereinigt, zur Erniedrigung der Salzkonzentration 1:3 mit 0,05 M Tris-Acetat pH 8, 0,25% K-Desoxycholat, 0,25% K-Cholat verdünnt, mit Hilfe der DEAE-Cellulose-Chromatographie konzentriert und erneut über Sephadex G-100 filtriert. Die Cytochrom b enthaltenden Fraktionen wurden schließlich nochmals durch Chromatographie an DEAE-Cellulose konzentriert und bei -70°C aufbewahrt.

3.3.4. Synthese von Oleyl-Polymethacrylsäure-Harz

Das Harz wurde gemäß dem von Weiß (33) entwickelten Verfahren nach folgendem Reaktionsschema synthetisiert:



Polymethacrylsäure-Harz (Amberlite CG 50 III, pract. Serva, Heidelberg) (1kg) wurde mehrmals mit verdünnter KOH, verdünnter HCl und H₂O gewaschen, mehrere Tage an der Luft und schließlich im Vakuumexsiccator über KOH-Plättchen getrocknet. Danach wurde das Harz (0,9 kg) mit der 3-4-fachen Menge (v/w) Thionylchlorid unter Rückfluß gekocht. Das überschüssige Thionylchlorid wurde zunächst durch Abnutschen und anschließend 6-8 Stunden bei 60°C durch Wasserstrahlvakuum entfernt. Das zum Teil chlorierte, zum Teil anhydrierte Harz konnte mehrere Monate gelagert werden.

Die Bedingungen für eine optimale Reaktion mit Oleylamin wurden für jeden Ansatz von aktiviertem Harz neu bestimmt. Dazu wurde ein kleiner Teil des Harzes (10 g) in Dichlormethan (80 ml) suspendiert. Danach wurde Oleylamin (10-20 ml) dazugegeben und schließlich Triäthylamin (15 ml). Das Reaktionsgemisch, das sich augenblicklich erwärmte, wurde 4-5 Stunden unter Rückfluß gekocht. Daraufhin wurde die Reaktionslösung abgenutscht. Das Harz wurde einmal mit Dichlormethan gewaschen und anschließen hintereinander mit verdünnter NaOH, Wasser und einer Lösung aus neun Teilen Aceton plus einem Teil konzentrierter HCl. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Zum Schluß wurde noch mehrmals mit Wasser nachgewaschen.

Die Ionenaustausch-Kapazität des entstandenen Harzes, die durch Titration mit NaOH bestimmt wurde, lag zwischen 5 und 6 mÄquivalent/g trockenen Harzes bei Zugabe von 10 ml Oleylamin (s.o.) und zwischen 2 und 3 mÄquivalent/g bei Zugabe von 20 ml Oleylamin. Für den Großansatz wurden die Bedingun-

gen gewählt, die eine Kapazität von 3,8 - 4,2 mÄquivalent/g Trockengewicht ergaben.

In dieser Form war das Harz einige Wochen haltbar. Längere Aufbewahrung führte zur Verschlechterung der Trenneigenschaften und der Durchströmbarkeit.

3.4. Vernetzungsreaktionen

Zu 25 µl einer 40 µM Cytochrom b Lösung in 0,3 M NaCl, 0,2 M Triäthanolamin-Hydrochlorid pH 8,5, 0,5% K-Cholat, 0,5% K-Desoxycholat wurden 250 µg Dimethylsuberimidat in 20 µl 0,2 M Triäthylamin-Hydrochlorid pH 8,5 (21) bzw. 15 µl einer 25% Glutardialdehydlösung (22) gegeben. Die Reaktionslösung wurde 2 Stunden bei 25° incubiert, danach 5 Stunden gegen Eiswasser dialysiert und lyophilisiert.

3.5. Auftrennung der Untereinheiten an Hydroxylapatit

Die Chromatographie an Hydroxylapatit in Gegenwart von Dodecylsulfat wurde nach der Methode von Moss und Rosenblum durchgeführt (25). 0,1-0,5 mg Cytochrom b wurden in 2-5 ml 0,01 M Na-Phosphat pH 6,4, 0,2% Na-Dodecylsulfat, 0,002 M Dithiotreitol gelöst und auf eine Bio-Gel HT-Säule (Bio-Rad, München) (0,5 x 10 cm), die in dem gleichen Puffer äquilibriert war, aufgetragen. Anschließend wurde mit einem linearen Gradienten (200 ml) eluiert, der von 0,01 M Na-Phosphat pH 6,4, 0,2% Na-Dodecylsulfat, 0,002 M Dithiotreitol auf 0,55 M Na-Phosphat pH 6,4, 0,2% Na-Dodecylsulfat, 0,002 M Dithiotreitol anstieg. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 3,5 ml/h. Fraktionen zu 3,5 ml wurden aufgesammelt. Die Chromatographie wurde bei 28° C durchgeführt.

Vor der Radioaktivitätszählung wurden die Fraktionen 10 h gegen 0,1% Na-Dodecylsulfat dialysiert, in Zählgläschen bei 50° C getrocknet und in 0,5 ml 0,5% Na-Dodecylsulfat, 0,1 M Tris-Acetat pH 8 aufgenommen.

3.6. Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung

3.6.1. Aminosäurezusammensetzung des Salzsäure-Hydrolysates

Proben zu 30 µg Protein wurden 10 h gegen Wasser dialysiert, lyophilisiert, zweimal mit je 1 ml Trichloressigsäure und einmal mit 1 ml Aceton gewaschen und in einem Glasröhrchen im Vakuumexsiccator getrocknet. Nach Zugabe von 200 µl 6 N Salzsäure (3 x destilliert) wurden die Röhrchen mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe evakuiert, mit Stickstoff begast und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Dieses Vorgehen zur Entfernung des Sauerstoffs wurde dreimal wiederholt. Zum Schluß wurden die Röhrchen evakuiert, zugeschmolzen und bei 105° C 24h, 50h oder 120h inkubiert. Anschließend daran wurde die Salzsäure mit Hilfe eines Rotationsverdampfers abgezogen und der Rückstand in 900 µl Citratpuffer pH 2 (0,25 M Na-Citrat-Hydrochlorid, 0,2 M Thiodiglycol) aufgenommen. Pro Analysenlauf wurden jeweils 300 µl eingesetzt.

Die Aminosäureanalysen wurden nach der Methode von Spackman et al. (26) mit einem automatischen Aminosäureanalysator (Biotronik, München) durchgeführt.

Für die Bestimmung von Methionin als Methioninsulfon und von Cystein als Cysteinsäure wurde das lyophilisierte Protein in 100 µl 100% Ameisensäure mit 50 µl Perameisensäure bei -7°C zur Reaktion gebracht. Nach 2 h wurden 3 ml Wasser zu dem Reaktionsgemisch gegeben und lyophilisiert. (Die Perameisensäure wurde aus 9,5 ml 100% Ameisensäure plus 0,5 ml Perhydrol durch 2 h Inkubation bei 25°C jedesmal frisch hergestellt und sofort verwendet (34).)

3.6.2. Spektroskopische Bestimmung des Tyrosin- und Tryptophangehaltes

Der Tyrosin- und Tryptophangehalt wurde nach der Methode von Bencze und Schmid bestimmt (28). 0,7 ml einer 3 µM Cytochrom b Lösung in 0,1 N NaOH, 1,5 M KCl, 0,5% K-Cholat, 0,5% K-Desoxy-

cholat wurden der Reihe nach mit 10, 5, 10 nMol Tyrosin versetzt. Nach jeder Zugabe wurde das Absorptionsspektrum von 350-250 nm gemessen und die Steigung (s) der gemeinsamen Tangente der beiden Absorptionsbanden ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4: Tyrosin- und Tryptophangehalt

Zugabe von Tyr	s x 10 ³	A _{max}	S	R	E _{1cm} ^{1%}	m	tyr try
(nMol)						(µg)	
00	0,41	0,275	1,50	1,50	176	10,94	1,50
10	1,18	0,305	3,86	1,85	171	12,49	1,42
15	1,55	0,330	4,70	1,98	169	13,67	1,37
25	2,63	0,365	7,20	2,34	165	15,48	1,34
Mittelwert							1,42

In dieser Tabelle bedeutet:

s : Extinktionsänderung ΔA zur Wellenlängenänderung Δnm

A_{max}:Extinktion des höheren der beiden Maxima

S : $S = \frac{s \times 10^3}{A_{\text{max}}}$

R :Molares Verhältnis tyr/try in der Probe. Dieser Wert ergab sich mit Hilfe des S-Wertes aus der von Bencze-Schmid angegebenen Tabelle (28).

E_{1cm}^{1%}:Extinktionskoeffizient einer 1% Lösung. Dieser Wert wurde ebenfalls der Tabelle entnommen (28).

m :Gesamtgehalt der Probe an Tyrosin und Tryptophan

$$m = \frac{7 \times 10^7 \times A_{\text{max}}}{E_{1\text{cm}}^{1\%}}$$

tyr/try:Aus R und m errechnetes molares Verhältnis dieser Aminosäuren.

3.7. Bromcyanspaltung und Auftrennung der Spaltprodukte

Proben zu etwa 30 µg Protein wurden mit 100 µl einer Lösung von 3% Bromcyan und 2% Na-Dodecylsulfat in 90% Ameisensäure

versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Stickstoff durchperlt und anschließend im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 12 h wurden 10 µl 10% Bromcyanlösung in Ameisensäure hinzugefügt. Es wurde erneut begast. Nach weiteren 15 h wurde das Reaktionsgemisch auf eine Bio-Gel P-30 Säule (Superfine, Bio-Rad, München) (0,6 x 250 cm), äquilibriert mit 85% Ameisensäure, aufgetragen. Bei einem hydrostatischen Druck von 140 cm betrug die Durchflußgeschwindigkeit 0,5 ml/h. Fraktionen zu 0,35 ml wurden aufgesammelt und zur Radioaktivitätszählung in 15 ml Szintillationslösung (siehe Kap. 3.9.) pipettiert.

3.8. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gele wurden auf folgende Weise hergestellt: 6,25 g Polyacrylamid (bzw. 3,75 g für 7,5% Gele), 0,17 g Bisacrylamid (bzw. 0,125 g) und 50 µg Ammoniumperoxydisulfat wurden in 50 ml 0,5% Na-Dodecylsulfat, 0,1 M Tris-Acetat pH 8 gelöst. Unmittelbar nach Zugabe von 50 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin wurde die Lösung in Formen gegossen. Die fertigen Gele wurden 24 h in 0,5% Na-Dodecylsulfat, 0,1 M Tris-Acetat pH 8 gelegt, um das überschüssige Ammoniumperoxydisulfat zu entfernen.

Die Proteinproben wurden in 20 µl 2% Na-Dodecylsulfat, 0,1 M Tris-Acetat pH 8, 5% Mercaptoäthanol aufgetragen.

Für die Elektrophorese in Gegenwart von 6 M Harnstoff wurde das System von Swank und Munkres (35) verwendet. Die Gele wurden in Röhrchen (0,6 x 15 cm) polymerisiert. Sie enthielten 10% Polyacrylamid und 0,5% Bisacrylamid. Als Kammerpuffer wurde 0,1% Na-Dodecylsulfat, 0,1 M Na-Phosphat pH 7,2 verwendet. Die Elektrophorese wurde mit 4 mA pro Röhrchen innerhalb von 20 h durchgeführt.

Zur Proteinfärbung wurden die Gele 2h in einer Lösung von 0,25% Coomassie-Brillant-Blau in Methanol-Wasser Essigsäure (5:5:1) geschwenkt. Anschließend wurden die Gele in derselben Lö-

sung ohne Farbstoff innerhalb von 24 h entfärbt.

Die Densitogramme wurden mit einem Perkin-Ellmer 156 Digital Double Wavelength Spektrometer bei dem Wellenlängenpaar 580 nm - 700 nm gemessen.

3.9. Verschiedene analytische Methoden

Die Absorptionsspektren wurden mit einem Beckmann Acta UV-Spektrophotometer oder mit einem Cary 118 Spektrophotometer gemessen.

Zur Aufnahme des Hämochromogenspektrums wurden 600 µg Cytochrom b zunächst mit 0,3 ml Aceton gewaschen und anschließend mit 0,3 ml Aceton-Salzsäure (6 ml Aceton, 50 µl Konzentrierte Salzsäure) extrahiert. Der Extrakt wurde mit 0,1 ml Äther und 0,3 ml 5% NaCl ausgeschüttelt und die Ätherphase mit 100 µl 5% NaCl gewaschen. Der Äther wurde durch Luftstrom entfernt. Der Rückstand wurde in 0,6 ml 2 M Pyridin, 0,75 M NaOH gelöst und durch Zugabe von einigen Körnchen Dithionit reduziert (14).

Zur Radioaktivitätszählung wurden die Proben in 0,5 ml 0,5% Na-Dodecylsulfat, 0,1 M Tris-Acetat pH 8 gelöst und mit 15 ml Szintillationslösung (6 g Butyl-PBD, 600 ml Toluol, 400 ml Äthylenglycolmonomethyläther) in einem Packard Tricarb Liquid Scintillation Spectrometer gezählt. Die Zählausbeute betrug für ^3H 65% und für ^{14}C 92%.

4. DISKUSSION

4.1. Cytochrom b, ein dimeres Hämprotein

Die Annahme, daß Cytochrom b ein dimeres Hämprotein ist, stützte sich im wesentlichen auf die unterschiedlichen Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmungen in Desoxycholat bzw. Dodecylsulfat. Während sich in Desoxycholat, einem milden Detergens (16), ein Molekulargewicht von etwa 55 000 ergab, betrug das Molekulargewicht in Dodecylsulfat, einem Detergens, das oligomere Proteine in Untereinheiten dissoziiert, nur etwa 28 000. Beide Molekulargewichtsbestimmungen waren nur Näherungsverfahren, da die Unterschiede in der spezifischen Detergensbindung des Cytochrom b und der zur Eichung verwendeten wasserlöslichen Proteine (11) nicht berücksichtigt wurden.

Die erhaltenen Werte konnten jedoch durch zwei weitere Ergebnisse bestätigt werden. Das minimale Molekulargewicht pro Mol Protohäm, das sich aus dem spezifischen Hämgehalt der Präparation ergab, war ungefähr gleich groß wie das Molekulargewicht von Cytochrom b in Dodecylsulfat. Nach intramolekularer Quervernetzung der Präparation in Desoxycholat ergab sich ein Reaktionsprodukt, das auch in Gegenwart von Dodecylsulfat das Molekulargewicht des dimeren Cytochrom b zeigte.

4.2. Identität oder Nichtidentität der Cytochrom b Untereinheiten

Die Frage, ob die beiden Cytochrom b Untereinheiten identisch sind, kann nach den vorliegenden Ergebnissen noch nicht mit Sicherheit beantwortet werden.

Die Aufspaltung der Proteinbande bei Gelelektrophorese nach langen Wanderstrecken deutete auf einen Unterschied im Molekulargewicht von 1 000 - 1 500 hin. Für die Nichtidentität sprach weiterhin ihre Trennbarkeit durch Chromatographie

an Hydroxylapatit in Gegenwart von Dodecylsulfat. Es wurde jedoch beobachtet, daß durch diese Methode auch Proteine gleicher Primärstruktur, aber unterschiedlicher Konformation getrennt wurden (25,36).

Die Aminosäurezusammensetzung der beiden Untereinheiten zeigte lediglich in Lysin- und im Cysteingehalt geringe Unterschiede. Diese können jedoch durch Verunreinigungen mit Lysin- und Cystein-reichen Proteinen vorgetäuscht worden sein.

Durch Bromcyanspaltung entstanden aus beiden Untereinheiten jeweils gleichgroße Fragmente in nahezu gleicher relativer Menge. Damit ist wahrscheinlich, daß die Untereinheiten über weite Bereiche die gleiche Primärstruktur besitzen. Aminosäureaustausche oder Modifikationen an Seitenketten, die nicht die Methioninreste betreffen, sind jedoch nicht auszuschließen.

Diese Ergebnisse machen wahrscheinlich, daß die beiden Untereinheiten von einem Gen codiert werden. Die beobachteten Unterschiede sind möglicherweise auf Modifikationen nach der Translation zurückzuführen.

4.3. Das dimere Cytochrom b, eine denaturierte Form des "b_Tb_K-Paares"

Aufgrund der Eigenschaften der lichtabsorbierenden Hämkomponente konnten in der Mitochondrienmembran zwei Arten von b-Cytochromen unterschieden werden. Ein sogenanntes "high potential" Cytochrom b oder b_K und ein "low potential" Cytochrom b oder b_T(1).

b_K zeigt bei Tieftemperatur eine α -Absorptionsbande bei 558 nm (*Neurospora crassa*), ist durch Succinat reduzierbar und hat ein Mittelpotential von 40 mV. b_T zeigt eine α -Absorptionsbande bei 563 nm, ist durch Succinat nur bei Anwesenheit von Antimycin reduzierbar und hat ein Mittelpotential von

-30 mV. In den Mitochondrien aller bisher untersuchten Organismen kommen diese beiden b-Cytochrome in äquimolarem Verhältnis vor.

Das isolierte dimere Cytochrom b zeigte dagegen bei Tieftemperatur nur eine etwas breitere Absorptionsbande bei 560nm (6), ist durch Succinat nicht reduzierbar und hat ein Mittelpotential von -56 mV (37). Weiterhin ist es im Gegensatz zu den Cytochrom b Arten in situ autoxidabel und reagiert mit Kohlenmonoxyd. Damit kann das isolierte dimere Cytochrom b weder dem b_T noch dem b_K zugeordnet werden.

Einige Befunde sprechen aber dafür, daß es eine "denaturierte Form" des $b_T b_K$ -Paares darstellt. So wurde bisher noch kein anderes Cytochrom b aus der Mitochondrienmembran isoliert (siehe Kap. 4.4.). Bei *Neurospora crassa* (10), *Locusta migratoria* (38) und bei Hefe (5) konnte nachgewiesen werden, daß das Cytochrom b Apoprotein ein Produkt der mitochondrialen Proteinsynthese ist. Andererseits war in Hefe und *Neurospora crassa* schon lange beobachtet worden, daß bei Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese durch Chloramphenicol die Neusynthese beider b-Cytochrome in gleicher Weise gehemmt ist (7).

Eine endgültige Beantwortung der Frage, ob das isolierte dimere Cytochrom b tatsächlich die denaturierte Form der beiden Cytochrom b Arten in situ darstellt, kann erst die Rekonstitution eines funktionsfähigen Membranbereiches unter Verwendung der isolierten Cytochrom b Untereinheiten erbringen.

4.4. Vergleich der in der Literatur beschriebenen Cytochrom b Präparationen

Neben der hier beschriebenen Präparation sind aus der Literatur noch vier weitere bekannt, in denen das Cytochrom b in vergleichbar reiner Form vorliegt (2,3,4,5). Diese wurden aus Rinderherz bzw. Hefe gewonnen. Für die Reindarstellung wurde zuerst der bc_1 -Komplex aus den Mitochondrienmembranen isoliert

Tabelle 5: Vergleich der von verschiedenen Autoren beschriebenen Cytochrom b Präparationen

Autor	spez. Häm- Gehalt	Moleku- largo- wicht. $\times 10^{-3}$	Vorliegen in Detergenzien			Extinktionsmaxima		Extinktions- koeffizienten		
			kation.	Decoxy- choleat	Dodecyl- sulfat	oxidier- te Form	reduzier- te Form	$\epsilon_{429\text{red}}$	$\epsilon_{562\text{red}}$ ox.	
$\mu\text{Mol/l}$										
Gold- berger et al. (Rinder- herz) (2)	36	20-30	monomer		polymer	538, 418	562, 532, 429	114,0	20,7	13,2
Ohnishi (Rinder- herz) (3)	41	24	unlös.	polymer		520- 570, 415	562, 531, 428		24,7	14,4
Yu et al. (Rinder- herz) (4)	26	37	unlös.	unlös.	monomer	560, 530, 417				
Weiß et Ziganke (Neuro- spora crassa)	36	28 55	unlös.	dimer	monomer	530- 570, 417	561, 530, 429	165	27	19
Lorenz et al.* (Locusta migrato- ria) (38)	40	25 55	unlös.	dimer	monomer	415	562, 531, 430			

*Gewonnen nach dem hier beschriebenen Verfahren

und anschließend in Gegenwart von Detergenzien durch Wärme-, Guanidinhydrochlorid- oder Proteaseeinwirkung gespalten. Dabei präzipitierte Cytochrom b und war auch in Gegenwart hoher Detergenkonzentrationen nur noch in hochpolymerer Form löslich. Aussagen über die Quartärstruktur konnten deshalb nicht gemacht werden.

Tabelle 6: Aminosäurezusammensetzung der von verschiedenen Autoren beschriebenen Cytochrom b Präparationen.

Aminosäure	Cytochrom b Präparation aus			
	Rinderherz	Saccharomyces cerevisiae	Neurospora crassa	
	(Ohnishi, ³)	(Yu et al, ⁴)	(Katan, ⁵)	
	Mol %			
Asp	6,4	7,9	8,6	8,6
Thr	7,0	6,4	5,3	4,8
Ser	5,8	5,8	5,7	8,5
Glu	5,8	5,6	6,6	6,2
Pro	4,5	6,0	4,9	5,0
Gly	9,6	7,9	6,5	7,5
Ala	10,2	7,9	7,6	7,7
Cys	1,9	2,4	n.d.	0,9
Val	5,8	5,1	9,4	6,9
Met	3,8	3,3	2,6	2,4
Ile	7,7	7,6	8,1	8,8
Leu	12,8	13,3	11,5	12,6
Tyr	4,5	3,6	3,4	4,2
Phe	7,0	5,5	8,4	6,5
Lys	2,6	3,7	4,4	3,0
His	1,9	3,0	2,9	2,6
Arg	3,2	2,9	3,9	3,7
Polarität	32,7	35,3	37,4	37,4

In den Lichtabsorptionseigenschaften, Lage der Extinktionsmaxima und Größe der Extinktionskoeffizienten, stimmten die Präparationen mit der hier beschriebenen Präparation gut überein (Tabelle 5). Auch in der Aminosäurezusammensetzung waren sie einander sehr ähnlich. Alle Präparationen zeigten einen hohen Leucin- und Isoleucingehalt und einen sehr niedrigen Gehalt an basischen Aminosäuren. Damit waren auch die Polaritätsindices sehr ähnlich (Tabelle 6).

Aufgrund dieser Ergebnisse kann vermutet werden, daß diese mit unterschiedlichen Methoden gewonnenen Präparationen das selbe Cytochrom b darstellen.

4.5. Cytochrom b, ein mitochondriales Translationsprodukt

Am Aufbau der inneren Mitochondrienmembran sind zwei räumlich getrennte Proteinsynthese-Systeme beteiligt, das cytoplasmatische System und das mitochondriale. Ihre unterschiedliche Hemmbarkeit durch Antibiotika ermöglicht die selektive Markierung der Produkte durch in vivo Einbau radioaktiver Aminosäuren. Durch solche Markierungsexperimente konnte in den letzten Jahren nachgewiesen werden, daß drei Untereinheiten der Cytochromoxydase, zwei bis vier Untereinheiten der mitochondrialen ATPase und die beiden Untereinheiten des Cytochrom b an den mitochondrialen Ribosomen synthetisiert werden (7). Es erhob sich die Frage, ob zwischen diesen mitochondrialen Translationsprodukten Ähnlichkeiten bestehen, die sie von den extramitochondrial synthetisierten Membranproteinen unterscheiden.

Nach bisherigen Untersuchungen scheint dies sehr wahrscheinlich. Alle mitochondrial synthetisierten Polypeptide zeigen einen ungewöhnlich hohen Leucin- und Isoleucingehalt (>12 Mol% bzw. >8 Mol%) und einen niedrigen Gehalt an basischen Aminosäuren, besonders an Lysin (3-4 Mol%) (39,40). Damit sind die Polaritätsindices, die zwischen 32,5% (Untereinheit I der Cytochromoxydase) und 40% (Untereinheit II der Cytochromoxydase) liegen,

ebenfalls sehr niedrig. Im Vergleich dazu haben die meisten cytoplasmatisch synthetisierten Membranproteine Polaritätsindices über 43% (z.B. die Untereinheiten IV-VII der Cytochromcydase mit 43,1%, F_1 der mitochondrialen ATPase mit 43,5% und die Untereinheit VI der ATPase mit 46,2%) (39,40).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Quartärstruktur von mitochondrialem Cytochrom b. Für diese Untersuchungen wurde das Cytochrom b aus Mitochondrienmembranen von *Neurospora crassa* gewonnen. Dieser Schimmelpilz zeigte gegenüber Säugetierorganen den Vorteil, daß die Proteine während der exponentiellen Wachstumsphase durch in vivo Einbau radioaktiver Aminosäuren markiert werden konnten. Dadurch war eine sehr rasche und empfindliche Proteinbestimmung möglich.

Das Cytochrom b wurde durch Chromatographie an Oleyl-Poly-methacrylsäure-Harz und anschließende Gelfiltration über Sephadex rein dargestellt. Die Präparation unterschied sich von den bisher in der Literatur beschriebenen Cytochrom b Präparationen dadurch, daß sie in Gegenwart von Desoxycholat in monodisperser Form vorlag und in dieser Lösung die für Cytochrom b charakteristischen Absorptionsspektren zeigte.

In dieser Desoxycholat-Lösung verhielt sich die Präparation bei Gelfiltration (und Ultrazentrifugation(11)) wie ein Protein mit dem Molekulargewicht von 58 000. In einer Dodecylsulfat-Lösung zeigte sie dagegen bei Gelfiltration und Gelelektrophorese ein Molekulargewicht von 28 000. Dieser Wert ergab sich auch als minimales Molekulargewicht aus dem spezifischen Hämgehalt der Präparation.

Intramolekulare Quervernetzung der Präparation mit den bifunktionellen Reagenzien Glutardialdehyd und Dimethylsuberimidat führte zu einem Reaktionsprodukt, das auch in Gegenwart von Dodecylsulfat ein Molekulargewicht von 55 000 zeigte.

Durch Chromatographie an Hydroxylapatit in Gegenwart von Dodecylsulfat wurde der Proteinanteil der Präparation in zwei Fraktionen ungefähr gleicher Proteinmenge aufgetrennt. Beide zeigten in Gegenwart von Dodecylsulfat ein Molekulargewicht von ungefähr 28 000.

Die Aminosäureanalyse der beiden Fraktionen ergab einen sehr hohen Gehalt an apolaren Aminosäuren, besonders an Leucin (13 Mol%) und Isoleucin (9 Mol%), und einen geringen Gehalt an basischen Aminosäuren, besonders Lysin (3 Mol%). Ein Unterschied zwischen den beiden Fraktionen wurde nur im Cystein- und im Lysingehalt gefunden. Letzteres wurde durch in vivo Einbau von ^3H -Lysin und ^{14}C -Leucin bestätigt. Freie N-terminale Aminosäuren konnten auch nach Kurzzeithydrolyse mit Salzsäure-Methanol zur Abspaltung einer möglichen Formylgruppe nicht nachgewiesen werden.

Beide Fraktionen waren weitgehend resistent gegen proteolytische Spaltung mit Trypsin.

Bei chemischer Spaltung mit Bromcyan entstanden aus beiden Fraktionen Bruchstücke jeweils gleichen Molekulargewichtes im gleichen relativen Anteil. Die Molekulargewichte lagen zwischen 1 500 und 9 000.

Diese Ergebnisse wurden folgendermaßen diskutiert: Cytochrom b ist aus zwei etwa gleichgroßen Häm-tragenden Untereinheiten aufgebaut. Die Untereinheiten besitzen wahrscheinlich über weite Bereiche die gleiche Primärstruktur. Es liegt damit nahe, daß sie von einem Gen kodiert werden. Die beobachteten Unterschiede müssen demnach auf Modifikationen nach der Translation zurückzuführen sein.

Außerdem wurde diskutiert, ob die dimere Cytochrom b Präparation die denaturierte Form des " $\text{b}_{\text{T}}\text{b}_{\text{K}}$ -Paares" darstellt. Aus dem Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen ergaben sich deutliche Hinweise dafür.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Wikström, M.K.F., (1973) Biochim.Biophys.Acta 301, 155-193
2. Bomstein, R. Goldberger, R. (1961) Biochem.Biop.Res.Comm. 2, 234-238
3. Ohnishi, K. (1966), J.Biochem. 59, 1-23
4. Yu, C.A., Yu, L., King, F.E. (1974), J.Biol.Chem. 249, 4905-4910
5. Katan, M.B., Groot, G.S.P. (1975)in:Electron Transfer Chains and Oxidative Phosphorylation, (eds. E. Quagliariello et al.) North Holland Publishing Company, Amsterdam, 127-132
6. Weiß, H. (1972), Eur.J.Biochem. 30, 469-478
7. Schatz, G., Mason, Th.L. (1974), Ann.Rev.Biochem.43, 51-87
8. Weiß, H., Ziganke, B. (1974), Eur.J.Biochem. 41, 63-71
9. Schwab, A.J., Sebald, W., Weiß, H. (1972) Eur.J.Biochem. 30, 511-516
10. Weiß, H., Ziganke, B. (1974), in: The Biogenesis of Mitochondria (eds.A.M.Kroon and C.Saccone), Academic Press London, 491
11. Weiß, H., Ziganke, B., Kolb, H.J. (1975), in: Electron Transfer Chains and Oxidative Phosphorylation (eds.E. Quagliariello et al), North Holland Publishing Company, Amsterdam, 15-22
12. Luck, D.J.L., (1963) J. Cell Biol. 16, 483
13. Weiß, H., v. Jagow, G., Klingenberg, M., Bücher, Th.(1970) Eur.J.Biochem. 14, 75-82
14. Paul, K.G., Theorell, H., Åkeson, Å., Acta Chemica Scandinavica (1953), 7, 1284-1287
15. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951), J. Biol.Chem. 193, 265-275
16. Helenius, A., Simons, K. (1975) Biochim. Biop.Acta 415,29-79
17. Helenius, A., Simons, K. (1972), J.Biol.Chem. 247,3656-3661
18. Tanford, C., Nozaki, Y., Reynolds, J.A., Makino, S.,(1974) Biochemistry 13, 2369-2376
19. Weber, K., Osborn, M. (1969), J.Biol.Chem.244, 4406-4412

20. Reynolds, J., Tanford, C. (1970), J.Biol.Chem.245, 5161-5165
21. Davies, G.E., Stark, G.R. (1970), Proc.Nat.Acad.Sci. USA 66, 651-656
22. Wold, F. (1967) Methods of Enzymology XI (ed.Hirs, C.H.W.), Academic Press, New York, 617-639
23. Svedberg, T. and Pederson, K.V. (1940), The Ultracentrifuge, Oxford, Clarendon
24. Yphantis, D.A. (1964) Biochemistry 3, 297-317
25. Moss, B., Rosenblum, E. (1972), J.Biol.Chem. 247, 5194-5198
26. Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore, S. (1958) Anal.Chem. 30, 1190-1206
27. Capaldi, R.A., Vanderkooi, G. (1972), Proc.Nat.Acad.Sci.USA 69, 930-932
28. Bencze, W.L., Schmid, K. (1957), Anal.Chem. 29, 1193-1196
29. Stark, G. (1967) Methods of Enzymology XI (ed.Hirs, C.H.W.) Academic Press, New York, 125
30. Scheelien, J.C., Yang, D.D.H. (1958), J.Am.Chem.Soc.80, 1154-1156
31. Gross, E., Witkop, B. (1962) J.Biol.Chem. 237, 1856-1860
32. Vogel, H.J. (1956) Microbiol.Genet.Bull. 13, 42
33. Weiß, H., Bücher, Th. (1970), Eur.J.Biochem. 17, 561-567
34. Mueller, J.M., Pierce, J.G. Davoll, H., Du Vigneaud, V., (1951), J.Biol.Chem. 191, 309-313
35. Swank, R.T., Munkres, K.D. (1971), Anal.Biochem., 39, 462-477
36. Bernardi, G., Kawasaki, T. (1968), Biochim.Biophys.Acta 160, 301-310
37. v. Jagow, G., persönliche Mitteilung
38. Lorenz, B., Kleinow, W., Weiß, H. (1973), Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 355, 300-304
39. Sebald, W., Machleidt, W., Otto, J. (1973) Eur.J.Biochem. 38, 311-324
40. Sebald, W., Jackl, G. (1975) in Electron Transfer and Oxidative Phosphorylation (eds. E. Quagliariello et al.) North Holland Publishing Company, Amsterdam, 193-198

LEBENS LAUF

25.11.1947	Geboren in Gorkij/UdSSR
1954-1958	Volksschule in Ulm
Sept. 1966	Abitur am Humboldt-Gymnasium in Ulm
WS 1966/67	Biologiestudium in Innsbruck
SS 1967- SS 1968	Biochemiestudium in Tübingen
WS 1968/69 WS 1972/73	Chemiestudium in Innsbruck
Feb. 1973	Chemie-Doktorandum (Promotionsvorprüfung)
März 1973- März 1975	Doktorarbeit am Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München, Lehrstuhl Professor Dr.Dr. h.c. Theodor Bücher, unter der Anleitung von Privatdozent Dr. Hanns Weiß über das Thema: "Zur Quartärstruktur von mitochondrialem Cytochrom b".
April 1975- März 1976	Fortführung der Arbeit als Gast im Europäischen Laboratorium für Molekularbiologie in Heidelberg, Arbeitsgruppe Privatdozent Dr. Hanns Weiß.

